

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293260 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.30

(22) Дата подачи заявки
2022.10.26

(51) Int. Cl. *C12N 1/20* (2023.01)
C12R 1/01 (2006.01)
A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/747 (2015.01)
C12R 1/225 (2006.01)

(54) КОНСОРЦИУМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ К4, ОБЛАДАЮЩИЙ
АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ
ВКЛЮЧЕНИЯ В КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ ПРИ ДИСБАКТЕРИОЗАХ И ДЛЯ
ПОВЫШЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА У КАРПОВЫХ РЫБ

(31) 2022/0461.2

(32) 2022.05.24

(33) KZ

(96) KZ2022/058 (KZ) 2022.10.26

(71) Заявитель:
ТОО "РЕСПУБЛИКАНСКАЯ
КОЛЛЕКЦИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ" (KZ)

(72) Изобретатель:

Текебаева Жанар Борамбаевна,
Шайхин Серик Мурзахметович,
Абилхадиров Арман Сабырович,
Темирханов Аслан Жанаевич,
Абжалелов Ахан Бегманович,
Сармурзина Зинигуль Сериковна
(KZ)

(74) Представитель:
Текебаева Ж.Б. (KZ)

(57) Патент на изобретение относится к биотехнологии и микробиологии, и касается получения препаратов пробиотического действия, кормовых добавок или премиксов, и может быть использован в рыбном хозяйстве, птицеводстве и животноводстве для профилактики и лечения бактериозов различной этиологии. Консорциум пробиотических бактерий К4 на основе штаммов *Lactobacillus fermentum* 24С В-РКМ 0817, *Pediococcus pentosaceus* 10/9К В-РКМ 0816, *Lactobacillus paracasei* 9С В-РКМ 0815 и *Lactobacillus paracasei* 12/2с В-РКМ 0815 обладает высокой антагонистической активностью к распространенным патогенам и способен повысить иммунный статус организма, а также восстанавливать нормальную микрофлору желудочно-кишечного тракта карповых рыб. Консорциум позволяет подавить рост таких возбудителей инфекционных заболеваний у рыб, как *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Staphylococcus* и *Escherichia*, *Salmonella* и др., улучшить микрофлору кишечника путем заселения полезными лактобактериями, а также улучшить параметры неспецифического иммунного ответа организма животных. Предлагаемый консорциум является экологичным и безопасным для рыбных хозяйств, не содержит ГМО, не токсичен, не патогенен, безвреден для людей, животных и растений и может служить альтернативным замещением химическим препаратам - антибиотикам при борьбе с бактериозами у рыб.

202293260
A1

202293260

A1

КОНСОРЦИУМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ К4,
ОБЛАДАЮЩИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ,
ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ ПРИ
ДИСБАКТЕРИОЗАХ И ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА У
КАРПОВЫХ РЫБ

Патент на изобретение относится к биотехнологии и микробиологии, и касается получения препаратов пробиотического действия, кормовых добавок или премиксов и может быть использовано в рыбном хозяйстве, птицеводстве и животноводстве для профилактики и лечения бактериозов различной этиологии.

Консорциум пробиотических бактерий К4 на основе штаммов *Lactobacillus fermentum* 24С В-RKM 0817, *Pediococcus pentosaceus* 10/9К В-RKM 0816, *Lactobacillus paracasei* 9С В-RKM 0815 и *Lactobacillus paracasei* 12/2с В-RKM 0896 обладает высокой антагонистической активностью к распространенным патогенам и способен повысить иммунный статус организма, а также восстановить нормальную микрофлору желудочно-кишечного тракта.

Массовый рост и интенсификация аквакультуры в последние десятилетия были связаны с многочисленными проблемами; одной из них являются болезни рыб, вызываемые патогенными бактериями (*Sahoo T.K. et al., Bacteriocins and their applications for the treatment of bacterial diseases in aquaculture: a review // Aquacult. Res., 2016. V. 47. PP. 1013–1027*). Пробиотики находят широкое применение в профилактике дисбактериозов молоди рыб (Клименко В. В. *Применение пробиотиков в ветеринарии // Биотехнология, экология, медицина: мат-лы III–IV Междунар. науч. семинаров. – Киров: Экспресс, 2002. С. 32–34*). Как правило, пробиотики включают полезные бактерии, среди которых наиболее изученными и наиболее часто используемыми являются бактерии рода *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacteria*, *Streptococcus* и др. Молочнокислые бактерии (МКБ), используемые для получения различных пробиотических препаратов признаны полностью безопасными и имеют статус GRAS (Generally Recognized as safe) от FDA (<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm153759.htm>). Пробиотики помогают в усвоении питательных веществ, в послестрессовой адаптации, улучшении микрофлоры кишечника при дисбактериозах, возникающих в результате лечения антибиотиками и химиопрепаратами.

В связи с этим для интенсивного рыбоводства актуальным является разработка новых биотехнологий выращивания, с использованием активных

и безопасных комбикормов, содержащих в своем составе современные препараты пробиотиков.

Известен зарубежный пробиотик «Пролам», состоящий из микробной массы микроорганизмов *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Bacillus sporothermodurans* 43с, *Lactococcus lactis subsp. lactis* 574, *Lactococcus lactis subsp. lactis* 170₄₋₅, *Bifidobacterium animalis* 8₃, молочной сыворотки, кукурузного экстракта и воды (93,7%) для профилактики дисбактериозов и повышения естественной резистентности сельскохозяйственных животных, птиц, рыб, а также повышения усвояемости кормов (<https://xn--80abhgo0bdpo5a.xn--p1ai/prolam>). Недостатком данного пробиотика является включение штамма бифидобактерии, не характерные для микробиоценоза кишечника животных.

Известен зарубежный биопрепарат «Аквалакт» на основе бактерии *Lactobacillus acidophilus*, повышающий резистентность рыб при расстройствах пищеварения, повреждении поверхностей тела, вызываемого бактериальным загрязнением воды. Лактобактерии, входящие в состав биопрепарата оказывают антагонистическое действие по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, сохраняют и регулируют физиологическое равновесие кишечной микрофлоры (Бурлаченко И.В., Бычкова Л.К. Способ клинической оценки состояния осетровых рыб при их культивировании в установках с замкнутым циклом водообеспечения // Рыбное хозяйство. 2005. №6. С. 70-72). Недостатком данного аналога является содержание в своем составе монокультуры бактерии одного рода, тогда как микроорганизмы в составе консорциума развиваются быстрее и имеют более высокий титр биомассы.

Известен отечественный консорциум микроорганизмов *Lactobacillus paracasei* 127, *Lactobacillus helveticus* 4Ш1, *Lactobacillus pontis* 9К3, *Lactobacillus paracasei* 129, *Sacharomyces cerevisiae* А-28 (Дудикова Г.Н., и др. Консорциум микроорганизмов *Lactobacillus paracasei* 127, *Lactobacillus helveticus* 4Ш1, *Lactobacillus pontis* 9К3, *Lactobacillus paracasei* 129, *Sacharomyces cerevisiae* А-28, используемый для приготовления препарата пробиотического действия. Патент КЗ № 28338 от 15.04.2014 г., бюл. №4), используемый для приготовления препарата пробиотического действия для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний человека, сельскохозяйственных животных и птиц. Недостатком данного изобретения является изучение антагонистической активности только к одному штамму - *Bacillus subtilis* и отсутствием данных по наиболее распространенным бактериальным патогенам, вызывающих расстройство желудочно-кишечного тракта животных, птиц и рыб.

Наиболее близким по технической сущности и достигаемому результату к заявляемому прототипу является отечественный пробиотический препарат «Биоконс» (Дудикова Г.Н., и др. Способ получения препарата «Биоконс». Патент КЗ № 23307 от 15.12.2010 г., бюл. №12), состоящий из консорциума молочнокислых бактерий *Lactobacillus brevis* - 67, *Lactobacillus casei* var. *alactosus* - 22, *Lactobacillus fermentum* - 96,

Lactobacillus fermentum - 104, *Lactobacillus plantarum* - 2, активный в отношении *Escherichia coli* и *Salmonella typhimutium* и рекомендуемый для профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний сельскохозяйственных животных и птиц. Недостатком данного аналога является изучение антагонистической активности только к 2 известным бактериальным патогенам как *E. coli* и *Sal. typhimutium*, а также отсутствие данных о влиянии консорциума на иммунную систему животных.

Задача патента на изобретение заключается разработке отечественного конкурентноспособного консорциума пробиотических бактерий на основе автохтонных штаммов для включения в кормовые добавки с высокой антагонистической активностью к различным возбудителям бактериозов у карповых видов рыб, а также улучшающих их иммунный статус.

Технический результат достигается за счет того, что данный консорциум будет являться основой пробиотического препарата с широким спектром подавления бактериальных возбудителей у рыб, экологически чистого и безопасного для людей, животных и растений, т.к. не содержит ГМО, служит альтернативным замещением лекарственными препаратами – антибиотикам.

Предлагаемый в качестве нового изобретения консорциум пробиотических бактерий состоит из местной автохтонной флоры молочнокислых бактерий, выделенной из кишечника рыб семейства карповых, депонированный в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» МОН РК под названием «Консорциум пробиотических бактерий К4» и присвоенным коллекционным номером К- RKM 1003.

В состав консорциума пробиотических бактерий К4 входят активные штаммы молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum* 24С В-RKM 0817, *Pediococcus pentosaceus* 10/9к В-RKM 0816, *Lactobacillus paracasei* 9с В-RKM 0815, *Lactobacillus paracasei* 12/2с В-RKM 0896. Штаммы пробиотического консорциума обладают биосовместимостью, что позволяет проводить процесс одновременного совместного культивирования, проявляя при этом синергетический эффект, имеют высокий титр клеток ($1,0-3,0 \times 10^9$ КОЕ/мл), обладают антагонистической активностью и устойчивостью к основным группам антибиотиков, используемых в рыбоводстве, устойчивы к высоким концентрациям желчи и кислот, обладают адгезивными свойствами. Все эти характеристики являются важными при разработке пробиотических препаратов на основе производственных штаммов. Стоит отметить, что штаммы консорциума способны улучшить параметры неспецифического иммунного ответа организма животных.

Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки штаммов, входящих в состав пробиотического консорциума К4:

Штамм *Lactobacillus fermentum* 24с представляет собой грамположительные палочки с закругленными концами, аэроб, оптимальная температура роста 37°C. На поверхности плотной среды MRS образует колоний молочного цвета, круглые, блестящие, с ровными краями, диаметром 0,5-1,5 мм. При росте на жидкой среде MRS образует осадок

молочного цвета с характерным кисломолочным запахом. Продукт, синтезируемый штаммом - молочная кислота.

Штамм *Pediococcus pentosaceus* 10/9к представляет собой грамположительные кокки, аэроб, оптимальная температура роста 37°C. На поверхности плотной среды MRS образует колонии бежевого цвета, выпуклые, круглые, гладкой поверхностью, ровными краями, диаметром 0,5-2 мм. При росте на жидкой среде MRS образует осадок молочного цвета с характерным кисломолочным запахом. Является продуцентом молочной кислоты.

Штамм *Lactobacillus paracasei* 9с представляет собой грамположительные длинные, тонкие палочки с овальными концами, аэроб, оптимальная температура роста 37°C. На поверхности плотной среды MRS образует мелкие колонии кремового цвета, округлой формы, непрозрачные, выпуклые, диаметром 0,5-1 мм. При росте на жидкой среде MRS образует осадок молочного цвета с характерным кисломолочным запахом. Продукт, синтезируемый штаммом - молочная кислота.

Штамм *Lactobacillus paracasei* 12/2с представляет собой грамположительные длинные палочки с закругленными концами, аэроб, оптимальная температура роста 37°C. На поверхности плотной среды MRS образует колонии молочного цвета, округлой формы, непрозрачные, выпуклые, диаметром 0,5-1,5 мм. При росте на жидкой среде MRS образует густой осадок молочного цвета с характерным кисломолочным запахом. Продукт, синтезируемый штаммом - молочная кислота.

Сущность полезной модели подтверждается следующим образом.

При разработке консорциума, в первую очередь, проверяют биосовместимость штаммов, входящих в его состав. Метод совместного культивирования показал, что культуры *Lactobacillus fermentum* 24с, *Pediococcus pentosaceus* 10/9к и *Lactobacillus paracasei* 9с и *Lactobacillus paracasei* 12/2с совместимы между собой и в результате роста не подавляют друг друга.

Способ получения пробиотического препарата заключается в совместном культивировании консорциума штаммов молочнокислых бактерий на усовершенствованной среде MRS собственной модификации (г/л): дрожжевой экстракт - 0,5; пептон - 10; глюкоза - 20; $(\text{NH}_4)_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ - 2; CH_3COONa - 5; K_2HPO_4 - 2; MnSO_4 - 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; твин 80 - 1 мл/л; лактоза - 1, рН=6,8.

Для наработки и получения пробиотика при глубинном культивировании в ферментере с подготовленной средой MRS вносят 5-10% от объема среды инокулята штаммов консорциума в соотношении 1:1:1:1 (25%:25%:25%:25%). Наращивают биомассу в течение 10-11 часов при скорости перемешивании 100 об/мин, потоке кислорода 5%, аэрации 20%, при рН равной 6,8 и температуре 37°C. Затем бактериальную массу отделяют от культуральной жидкости путем центрифугирования при 4°C и скорости 8000 rpm. Полученную микробную биомассу клеток отмывают трижды физиологическим раствором и с помощью стандарта мутности по

МакФарланду готовят нужную концентрацию пробиотика. В течение срока хранения штаммы консорциума сохраняют высокий титр клеток (не менее 10^8 КОЕ/мл).

Для длительного хранения консорциума полученную микробную пасту смешивают с защитной средой в соотношении 1:1, разливают во флаконы по 2 мл, замораживают сначала при температуре -20°C , затем при -80°C . Далее проводят лиофилизацию консорциума, флаконы укупоривают стерильными пробками и закатывают металлическими колпачками. Лيوфильно высушенный концентрат хранят при температуре $+4-6^{\circ}\text{C}$.

Пример 1.

1. Изучена антагонистическая активность консорциума пробиотических бактерий К4 к различным условно-патогенным и патогенным микроорганизмам, имеющихся в Биобанке промышленных микроорганизмов РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» МЗ РК (таблица 1) методом диффузии в агар (Нетрусов А.И. *Практикум по микробиологии*. – М.: Академия, 2005. 119 с).

По полученным данным, установлено, что консорциум пробиотических бактерий К4 обладает высокой антагонистической активностью (100%) по отношению к широкому спектру патогенных бактерий, вызывающие инфекционные заболевания у рыб, животных и птиц. Зоны ингибирования роста тест-штаммов варьировала от $12,8 \pm 0,48$ мм (у *Enterococcus faecium*) до $17,8 \pm 0,25$ (у *Pseudomonas taiwanensis*).

Изучена чувствительность к антибиотикам (таблица 2) консорциума пробиотических бактерий К4 диско-диффузионным методом (Нетрусов А.И. *Практикум по микробиологии*. – М.: Академия, 2005. 119 с) с использованием имеющихся дисков с антибиотиками.

Выявлено, что исследуемый консорциум резистентен к гликопептидному антибиотику ванкомицину, аминогликозидам – канамицину, неомицину и гентамицину, β -лактамному антибиотику цефазолину и антибиотику фторхинолового ряда ципрофлоксацину. Следует отметить, что в некоторых странах, входящих в состав Международного эпизотического бюро, в борьбе с болезнями в аквакультуре рыб используются такие антибиотики как неомицин, ципрофлоксацин, канамицин. Данный консорциум на основе пробиотических бактерий может рекомендоваться в качестве пробиотической добавки в рацион рыб для нормализации микробиоты желудочно-кишечного тракта, повышения иммунного статуса, а также альтернативы таким терапевтическим препаратам как неомицин, канамицин и ципрофлоксацин.

Изучена толерантность к желчи (таблица 3) штаммов консорциума пробиотических бактерий К4 при уровнях солей желчных кислот от 2000 до 4000 частей на миллион (ppm) (Arihara K., et al. *Lactobacillus acidophilus Group Lactic Acid Bacteria Applied to Meat Fermentation //J. of Food Science*. 2008. V. 63, Iss. 3. PP. 544-547).

Установлено, что все штаммы способны к росту в присутствии желчных солей в концентрации от 2000 ppm до 3000 ppm. И только один

изолят *Pediococcus pentosaceus* 10/9к может расти при концентрации бычей желчи 4000 ppm.

Изучена способность молочнокислых бактерий к автоагрегации (рисунок 1) согласно известному протоколу измерением оптической плотности в течение 5 часов (Kos B., et al. *Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92* // *Journal of Applied Microbiology*. 2003. V. 94. PP. 981–987).

Выявлено, что процент автоагрегации штаммов консорциума варьирует от 23,64% до 44,2%, что свидетельствует о высокой способности колонизировать стенки кишечника животных.

Пример 2.

Согласно современным данным, пробиотические микроорганизмы оказывают влияние не только на микрофлору кишечника организма, но и на его эпителий и иммунную систему (Усенко Д.В., Горелов А.В. *Пробиотики и пробиотические продукты: возможности и перспективы применения* // *Вопросы современной педиатрии*, 2004. №2. С. 50-54).

Автохтонная, т.е., коренная кишечная микробиота играет центральную роль в развитии и модуляции врожденной и адаптивной иммунных систем слизистой оболочки и играет важную роль в обеспечении защиты от патогенных микробов, поддерживая целостность кишечника и регулируя проницаемость кишечного барьера.

В связи с этим, изучено влияние консорциума пробиотических бактерий К4 на параметры врожденного иммунитета, а именно активности альтернативного ответа, активность лизоцима, фагоцитарной активности и активности респираторного взрыва сыворотки крови карповых рыб.

Определение активности альтернативного гемолитического комплемента (АСН50) проводилось по стандартному методу с эритроцитами овцы в качестве клеток-мишеней (Hakim C. Samai, et al. *Procedures for leukocytes isolation from lymphoid tissues and consequences on immune endpoints used to evaluate fish immune status: A case study on roach (*Rutilus rutilus*)* // *Fish and Shellfish Immunology*, 2018. V.74. PP. 190-204). Были исследованы следующие группы кормления рыб семейства карповых (*Cyprinus carpio*) в модельном эксперименте: 1 группа – добавление пробиотика в концентрации 10^6 к основному рациону, 2 группа - добавление пробиотика в концентрации 10^8 к основному рациону, 3 группа – добавление коммерческого пробиотика «Ветом-1» (Россия) к основному рациону на основе живых спорообразующих бактерий штамма *Bacillus subtilis*, 4 группа - основной рацион в виде коммерческого корма Color Scale (Китай), контроль (рисунок 2).

Выявлено, что оба варианта пробиотических добавок препарата К4 в двух концентрациях (10^6 и 10^8 КОЕ/мл) и коммерческий препарат Ветом 1 показали активацию АСН50 на 26, 31 и 23 % соответственно по сравнению с группой в нулевой точке отсчета после 4 недель от начала кормления.

Таким образом, параметр АСН 50 у рыб двух первых групп с препаратом К4 и коммерческим препаратом Ветом 1 имеет тенденцию к активации и зависит как от концентрации пробиотиков в препарате К4, так и

от длительности введения препарата К4 в корм рыб. Коммерческий пробиотик Ветом 1 уступает ($p < 0.05$) по активации АСН50 в концентрации, предложенной производителем.

Изучена активность сывороточного лизоцима (рисунок 3) стандартным методом (*Ann-Chang Cheng, et al. Effects of temperature change on the innate cellular and humoral immune responses of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* // Fish Shellfish Immunol., 2009. V. 26(5). PP. 768-72*).

Активность лизоцима в плазме крови рыб через 4 недели от начала кормления пробиотиками по группам составила $50 \pm 0,01$; $52 \pm 0,01$; $53 \pm 0,02$ и $20 \pm 0,01$ (ед/мл) соответственно.

Установлено, что пробиотические добавки активировали лизоцим в первых трех группах на 89%, 102% и 80% на четвертой неделе от начала кормления. Активность лизоцима в плазме крови рыб контрольной группы практически не изменялась.

Таким образом, консорциум пробиотических бактерий К4 в двух концентрациях (10^6 и 10^8 КОЕ/мл) обладает высокой антибактериальной активностью против большинства возбудителей инфекционных заболеваний у карповых рыб, способен восстанавливать нормальную микрофлору желудочно-кишечного тракта, а также улучшить параметры неспецифического иммунитета организма сеголеток карпа.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Консорциум пробиотических бактерий К4 на основе автохтонных штаммов молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum* 24С В-РКМ 0817, *Pediococcus pentosaceus* 10/9К В-РКМ 0816, *Lactobacillus paracasei* 9С В-РКМ 0815 и *Lactobacillus paracasei* 12/2с В-РКМ 0896, депонированный в РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов» КН МОН РК под регистрационным номером К-РКМ 1003, обладающий антибактериальной активностью, предназначенный для включения в кормовые добавки при дисбактериозах и для повышения иммунного статуса у карповых рыб.

КОНСОРЦИУМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ К4,
ОБЛАДАЮЩИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ,
ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В КОРМОВЫЕ
ДОБАВКИ ПРИ ДИСБАКТЕРИОЗАХ И ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ИММУННОГО СТАТУСА У КАРПОВЫХ РЫБ

Таблица 1 – Антибактериальная активность консорциума К4

№ п/п	Наименование тест-штаммы	Зона подавления роста тест- штаммов, мм
1	<i>Aeromonas punctata</i> B-RKM 0287	13,5±0,29
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-RKM 0427	16,3±0,63
3	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> B-RKM 0726	17,8±0,25
4	<i>Shewanella ximenensis</i> B-RKM 0724	14,3±0,48
5	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 B-RKM 0447	14,8±0,25
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-RKM 0444	15,8±0,75
7	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 B-RKM 0470	13,8±1,65
8	<i>Salmonella enteriditis</i> B-RKM 0680	15,0±0,41
9	<i>Enterococcus faecium</i>	12,8±0,48
10	<i>Bacillus cereus</i> B-RKM 0664	14,8±0,85
11	<i>Micrococcus luteus</i> B-RKM 0374	13±0,71
*Примечание: Антагонистическая активность считается нулевой при зоне отсутствия роста до 1,0 мм, низкой – при 1,1 – 4,9 мм, средней – при 5,0 – 8,9 мм, высокой при 9,0 мм и более		

КОНСОРЦИУМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ К4,
ОБЛАДАЮЩИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ,
ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В КОРМОВЫЕ
ДОБАВКИ ПРИ ДИСБАКТЕРИОЗАХ И ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ИММУННОГО СТАТУСА У КАРПОВЫХ РЫБ

Таблица 2 - Определение чувствительности к антибиотикам
консорциума К4

Антибиотик	Результаты	Антибиотик	Результаты
P 10	S (31,5)	GEN 10	R (9,5)
TE 30	I (20)	CB 25	I (20,5)
RO 30	S (32)	FUZ 10	R
K 30	R	OL 15	R (12,5)
AMP 25	S (25,5)	RIF 5	S (24,0)
AMC 30	S (27,5)	N 30	R
CD 10	S (31,5)	CIP 5	R
CZ 30	R	E 15	S (25)
VA 5	R	LEV 30	I (19,5)
<i>Примечание:</i> S – чувствительный, I – промежуточно-чувствительный, R – устойчивый (резистентный)			

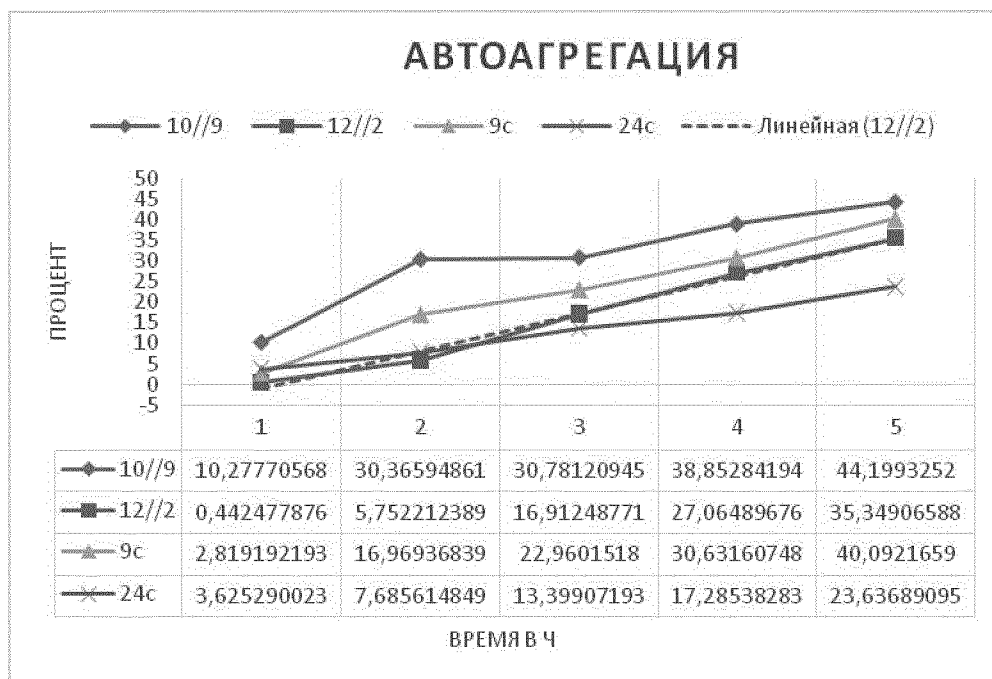
КОНСОРЦИУМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ К4,
ОБЛАДАЮЩИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ,
ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В КОРМОВЫЕ
ДОБАВКИ ПРИ ДИСБАКТЕРИОЗАХ И ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ИММУННОГО СТАТУСА У КАРПОВЫХ РЫБ

Таблица 3 - Толерантность штаммов консорциума К4 к солям желчных кислот

Концентрация желчных солей, ppm	24с	9с	12/2с	10/9к
2000	++	++	++	++
3000	+	+	+	++
4000	-	-	-	+
<i>Примечание:</i> ++ хороший рост; + видимый рост; - нет роста				

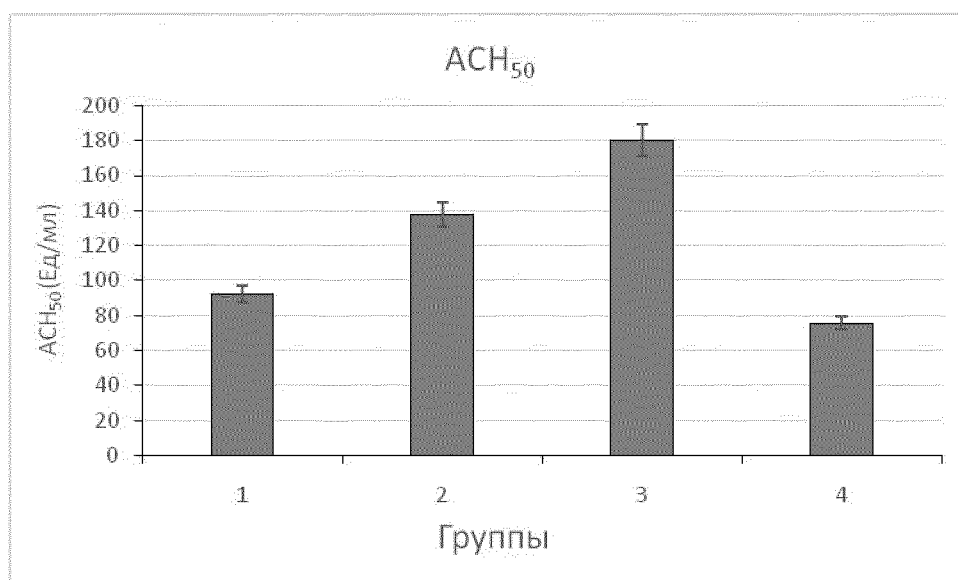
КОНСОРЦИУМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ К4, ОБЛАДАЮЩИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В КОРМОВЫЕ ДОБАВКИ ПРИ ДИСБАКТЕРИОЗАХ И ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА У КАРПОВЫХ РЫБ

Рисунок 1 – Способность к автоагрегации консорциума



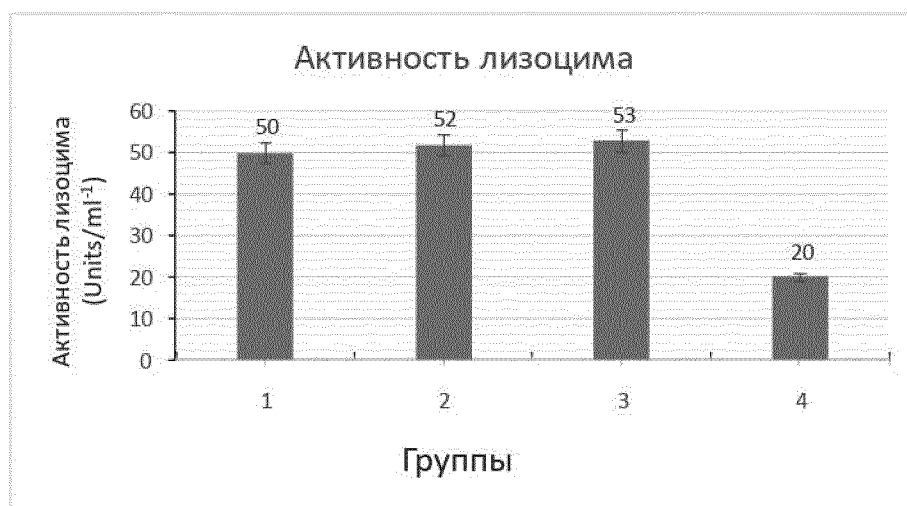
КОНСОРЦИУМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ К4,
ОБЛАДАЮЩИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ,
ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В КОРМОВЫЕ
ДОБАВКИ ПРИ ДИСБАКТЕРИОЗАХ И ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ИММУННОГО СТАТУСА У КАРПОВЫХ РЫБ

Рисунок 2 - Активность альтернативного гемолитического
комплемента (ACH₅₀) в сыворотке крови рыб



КОНСОРЦИУМ ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ К4,
ОБЛАДАЮЩИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ,
ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЙ ДЛЯ ВКЛЮЧЕНИЯ В КОРМОВЫЕ
ДОБАВКИ ПРИ ДИСБАКТЕРИОЗАХ И ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ
ИММУННОГО СТАТУСА У КАРПОВЫХ РЫБ

Рисунок 3 – Активность сывороточного лизоцима



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202293260

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 1/20 (2023.01)
C12R 1/01 (2023.01)
A23L 33/135 (2023.01)
A61K 35/747 (2023.01)
C12R 1/225 (2023.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
C12N 1/20, C12R 1/01, A23L 33/135, A61K 35/747, C12R 1/225

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)
Espacenet, ЕАПАТИС, EPOQUE Net, Reaxys, Google

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	RU 2768281 C1 (ООО "АЛТБИОТЕХ") 2022-03-23 реферат	1
A	RU 2717991 C1 ("ГИПРОБИОСИНТЕЗ"ООО") 2020-03-27 реферат	1
A	CN 110832067 A (OAKBIO INC.) 2020-02-21 реферат	1
A	EL-SAADONY MT et al. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. FISH SHELLFISH IMMUNOL. 2021;117:36-52. doi:10.1016/j.fsi.2021.07.007 Abstract	1

☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"Р" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

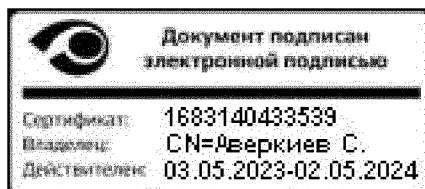
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 28 июня 2023 (28.06.2023)

Уполномоченное лицо:
Начальник Управления экспертизы



С.Е. Аверкиев